

AUS DEM PATHOLOGISCHEN INSTITUT DER UNIVERSITÄT BASEL

(Vorsteher: Prof. Dr. A. WERTHEMANN)

Arbeit unter Leitung von Prof. S. SCHEIDEGGER

Wert und Möglichkeiten der sogenannten histologischen Schnelldiagnosen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät der Universität Basel

vorgelegt von

CHRISTWARD VON POLZER-HODITZ

von Beinwil (Sol.)

BASEL 1952

Von der Medizinischen Fakultät Basel genehmigt auf Antrag
von Herrn Prof. S. SCHEIDEGGER
Tag der Promotion : 6. Juli 1950

Sonderdruck aus «Mikroskopie», Zentralblatt für mikroskopische Forschung und Methodik,
Band 6, Heft 11/12, 1951, S. 339-352

Sonderdruck aus: »MIKROSKOPIE«

ZENTRALBLATT FÜR MIKROSKOPISCHE FORSCHUNG UND METHODIK

Hauptschriftleitung Prof. Dr. Alfred Grabner und Prof. Dr. Josef Kisser

Verlag G. Fromme & Co., Wien V, Nikolsdorfer Gasse 11 · Tel. B 23-3-56

Band 6 / Heft 11/12

1951

Seiten 339—352

(Aus dem Pathologischen Institut der Universität Basel.
Vorstand: Prof. Dr. A. Werthemann)

Wert und Möglichkeiten der sogenannten histologischen Schnelldiagnosen

Von CHRISTWARD von POLZER-HODITZ

Arbeit unter der Leitung von Prof. Dr. S. SCHEIDEGGER

Überreicht vom Verfasser



(Aus dem Pathologischen Institut der Universität Basel.
Vorstand: Prof. Dr. A. Werthemann)

Wert und Möglichkeiten der sogenannten histologischen Schnelldiagnosen

Von CHRISTWARD von POLZER-HODITZ

Arbeit unter der Leitung von Prof. Dr. S. SCHEIDEGGER

Zu den Problemen auf dem Gebiet der histologischen Diagnostik gehören die sogenannten Schnellverfahren, welche ermöglichen sollen, innert weniger Minuten — z. B. im Verlauf einer Operation — eine zuverlässige histologische Diagnose zu stellen. Solche Schnellverfahren sind aus dem Grunde problematisch, weil eine Diagnosenstellung in sehr kurzer Zeit gefordert wird, weil eine Wiederholung der Untersuchung im Falle eines mißglückten oder aufschlußarmen Resultates nicht in Frage kommt und auch keine weiteren speziellen Färbemethoden angewandt werden können. Es werden Anforderungen an den Pathologen und an die Technik gestellt, die zum Teil gar nicht erfüllbar sind. Das alles hat zur Folge, daß eine große Erfahrung für solche Schnelldiagnosen notwendig ist und sich eine ganz spezielle Technik dafür entwickelt hat.

Bei dieser herrschenden Problematik kann man sich die Frage stellen, ob das Arbeiten mit Schnellverfahren überhaupt beibehalten werden soll, ob es berechtigt ist und ob es sich — im weitesten Sinne — lohnt. Die Situation ist aber so, daß Schnelldiagnosen in vielen Fällen unentbehrlich geworden sind: Es ist oft von entscheidender Wichtigkeit, mit einer Operation auszukommen. Bei zweizeitigen Operationen von malignen Geschwülsten und von Granulationsgeweben besteht oft die Gefahr einer Verschleppung und „Aktivierung“ während der ersten Operationsphase.

Auf die Notwendigkeit von Schnelldiagnosen ist damit wohl zur Genüge hingewiesen. Doch wird die allgemeine Verwendbarkeit derselben leider durch die negativen Seiten eingeschränkt: Schnellpräparate sind immer minderwertig gegenüber den mit großem Zeitaufwand hergestellten Präparaten. Manche Gewebe sind an sich schlecht zu Schnelluntersuchungen geeignet — z. B. lymphatische Gewebe —, einige kommen überhaupt nicht dafür in Frage, z. B. Knochengewebe.

Phase der Schnelldiagnose ¹⁾	Handelnde Person
1. Entnahme des Materials	Operateur
2. Transport des Materials	Mit Transport beauftragte Personen
3. Aufarbeitung des Materials	Pathologe
4. Abgabe des Berichtes	Pathologe bzw. Meldung vermittelnde Personen
5. Reagieren des Operateurs	Operateur

¹⁾ Hier ist darunter das ganze Geschehen vom Moment an, wo sich der Operateur entschließt, eine Schnell-

Selbstverständlich darf man von Schnellverfahren andererseits auch nicht mehr verlangen als von Standardverfahren.

So notwendig die Schnellverfahren in der histologischen Diagnostik sind, so wichtig ist es, Kritik an den Resultaten zu üben und Schnellverfahren nur nach strenger Indikation zu verwenden.

Wenn man die verschiedenen für die Schnelldiagnose ausgearbeiteten Verfahren überblickt oder mit ihnen zu arbeiten beginnt, bemerkt man bald, daß jeder Methode für sich ein ganz bestimmtes Anwendungsgebiet innerhalb der histologischen Diagnostik zukommt, auf welchem sie leistungsfähig ist. Bei jedem Verfahren gibt es aber auch einen mehr oder weniger großen Bereich, auf welchem mit Versagern gerechnet werden muß. Nun ist aber ein histologisches Diagnoseverfahren eigentlich erst brauchbar, wenn es zuverlässig ist. Eine Diagnose sollte sich nicht auf klinische Angaben stützen müssen, sondern das Verfahren soll erlauben, Organdiagnose und pathologische Veränderung einwandfrei zu erkennen.

Im folgenden sollen Lösungen für das hier angegebene Problem erörtert werden:

Ideal wäre natürlich in gewissem Sinne ein Verfahren, welches allen Anforderungen auf dem gesamten Gebiet der histologischen Schnelldiagnostik voll gerecht werden würde und bei dem keine Kunstprodukte möglich sind. Ein derartiges Verfahren ist aber bis heute nicht bekannt.

Ein anderer Vorschlag, der zwar nicht als einwandfrei gelten kann, aber für praktische Zwecke geeignet erscheint, wäre, sich auf ein einziges Verfahren zu beschränken, welches nur in sehr seltenen Fällen versagt. Man könnte das bezeichnen als ein Arbeiten mit dem „optimalen“ Verfahren. Das ist natürlich eine Abstraktion, denn bei der Beurteilung eines Verfahrens kommt es unter anderem auch auf die persönliche Erfahrung und Gewohnheit des Arbeitenden an: für den einen Untersucher ist diese, für den anderen jene Methode „optimal“.

Als dritte Möglichkeit wäre zu nennen, für jeden Fall individuell ein geeignetes Verfahren zu wählen, wie dies in der gewöhnlichen histologischen Diagnostik gehandhabt wird. Vom sachlichen Standpunkt aus wäre das wohl die beste Lösung. Sie ist für die Schnelldiagnostik aber sehr umständlich und unbequem: Erstens müßten viele verschiedene Schnellverfahren sowie in alle diese Methoden eingearbeitete Untersucher zur Verfügung stehen. Zweitens würden in den meisten Fällen klinische Angaben vor-

Fehlermöglichkeiten

Präventivmöglichkeiten

- a) Zu wenig Material vorhanden oder entfernbar
- b) Artefakte durch Entnahme (z. B. Diathermie)
- c) Maßgebendes Gewebe an sich ungünstig (z. B. atypisch)

Anleitung durch Pathologen

- a) Ungeeigneter Transport
- b) Zu langsamer Transport
- c) Verwechslungen, Mißverständnisse

Anleitung durch Pathologen
 Auswahl zuverlässiger Personen
 und geeigneter Transportverfahren

Wird weiter unten erörtert

Mißverständnisse, Verwechslungen

Auswahl zuverlässiger Personen

Nicht sinngemäßes Handeln
 (falsche Auswertung des Berichtes)

Zusammenarbeit zwischen
 Operateur und Pathologen

diagnose stellen zu lassen, bis zu dem Moment, wo er dem Resultat derselben entsprechend handelt, verstanden

ausgesetzt, denn orientierende Voruntersuchungen kommen ja bei Schnelldiagnosen nicht oder nur höchst selten und in begrenztem Umfang in Frage. Mit klinischen Angaben kann aber nicht immer gerechnet werden, und zudem ist es, wie schon oben erwähnt, aus prinzipiellen Gründen unangebracht, bei der Diagnose auf klinische Angaben abzustellen. Drittens müßten die Anwendungsgebiete und Fehlergrenzen der verschiedenen Verfahren genau bekannt sein.

Schließlich sei als vielleicht empfehlenswertestes Vorgehen die Kombination zweier oder eventuell mehrerer Verfahren genannt, die sich derart ergänzen, daß Fehlschlüsse, welche der einen Methode zur Last fallen, durch Vergleich mit den anderen korrigiert werden können. Ohne Zweifel lassen sich zwei Verfahren finden, bei welchen es praktisch ausgeschlossen ist, daß beide denselben Fehler mit sich bringen. Durch prinzipiell paralleles Untersuchen nach zwei derart gewählten Verfahren wäre zumindest die Gefahr von Fehldiagnosen — soweit die Methode dafür verantwortlich ist, und nur darum handelt es sich hier — so gut wie beseitigt.

Wir haben folgende Möglichkeiten erwähnt:

1. „Idealverfahren“,
2. „optimales“ Verfahren,
3. je nach Fall individuelles Verfahren,
4. geeignete Kombination zweier Verfahren.

Aus allen diesen Ausführungen geht hervor, wie wichtig es ist, die Grenzen jeder Methode genau zu erkennen. Um nun ein histologisches Schnelldiagnoseverfahren auf seine Leistungsfähigkeit zu prüfen, müßten eigentlich alle Gewebe des Organismus und alle in Frage kommenden pathologischen Veränderungen an denselben einer Untersuchung damit unterzogen werden.

Was die Schnelldiagnose — im Vergleich zu der histologischen Diagnostik im allgemeinen — so kompliziert macht, ist gar nicht etwa in erster Linie die Frage der Zeiteinsparung: Die technischen Schwierigkeiten, die sich durch eine Zeitreduktion ergeben, sind einerseits nicht sehr groß, auf der anderen Seite kommt es auch nicht so sehr darauf an, ob das Verfahren ein paar Minuten mehr oder weniger beansprucht. Aber die Einmaligkeit der Untersuchung, die begrenzte Möglichkeit einer Paralleluntersuchung, die Frage, ob überhaupt eine Diagnose gestellt werden kann, und noch

viel mehr, ob auf dem eingeschlagenen Weg die richtige Diagnose gestellt werden kann, das ist der springende Punkt; das ganze Spiel wird gleichsam auf eine Karte gesetzt. Die Schattenseite, die eigentliche Gefahr der Schnellverfahren, ist die Möglichkeit der Fehldiagnose.

Um der Gefahr eines Mißlingens einer Schnelldiagnose zu begegnen, ist es notwendig, sich über die möglichen Ursachen Rechenschaft zu geben. Die Übersicht in Tabelle 1 soll die Vielfalt der in Frage kommenden Ursachen veranschaulichen.

Die in obiger Tabelle eingerahmte dritte Phase, die Schnelldiagnose im eigentlichen Sinne, wird erörtert in der nun folgenden

Zusammenfassung und Charakterisierung verschiedener Schnellverfahren

In der histologischen Technik kann die Herstellung von Hämatoxylin- bzw. Hämalaun-Eosin-gefärbten Paraffinschnitten gewissermaßen als Standardverfahren betrachtet werden, da diese Methode allgemein im Gebrauch ist. Von diesem Prinzip soll daher ausgegangen und festgestellt werden, worin die verschiedenen Schnellverfahren davon abweichen.

Das genannte Standardverfahren läßt sich in vier Hauptphasen unterteilen:

1. Fixierung,
2. Schnittherstellung,
3. Färbung,
4. Einschluß.

Jede dieser vier Phasen ist mit einer Reihe von gewissen Einzelbehandlungen des Untersuchungsmaterials verknüpft: Das Fixieren erfordert nachträgliches Auswaschen. Das Paraffinschneiden bedingt das Entwässern, Durchtränken, Einbetten, Aufkleben, Trocknen, Entfernen des Paraffins. Das Färben bringt die Anwendung einer sogenannten absteigenden Alkoholreihe, Differenzieren und Auswaschen mit sich. Der Einschluß endlich macht eine aufsteigende Alkoholreihe inklusive Karbol-Xylol und Xylol notwendig.

Dieses Verfahren beansprucht eine oft mehrere Tage dauernde Zeit. Eine Übersicht soll nun veranschaulichen, welche Möglichkeiten es gibt, um bei Schnelldiagnosen Zeiteinsparungen zu erreichen.

Tabelle 2

Behandlungsphase	Abkürzungsmöglichkeit
1. Fixieren	a) weglassen, b) Anwendung heißer Fixierungsmittel, c) stärker konzentrierte Fixativa, d) unfixiert schneiden, Schnitte fixieren, e) Ausstriche herstellen statt Schnitte;
2. Schneiden	a) weglassen (Ausstriche statt Schnitte), b) „von Hand“ (ohne Mikrotom) schneiden, c) Gefrierschneiden, d) andere Einbettungsmittel,
3. Färben	a) weglassen, Phasenkontrastmikroskopie, b) Farblösungen erwärmen, c) stärker konzentrierte Farblösungen verwenden, d) spezielle, rasch färbende Farbstoffe verwenden, e) flottierend färben;
4. Einschließen	a) weglassen, b) andere Einschlußmittel verwenden (z. B.. Glyzerin).

Es ist auch denkbar, daß alle Phasen zugleich weggelassen werden können und ähnlich einer Urinsedimentuntersuchung an Stelle eines Einschlußmittels körpereigene Flüssigkeit verwendet wird.

Abgesehen von diesen Abkürzungsmöglichkeiten kann auch eine Zeitreduktion durch Steigerung der persönlichen Geschicklichkeit erreicht werden.

Gehen wir nun an die kritische Beurteilung der Abkürzungsmöglichkeiten, wie sie in Tabelle 2 veranschaulicht sind:

I. Zur Frage der Fixierung

Die Histologie erwirbt ihre Kenntnisse in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle an aus dem Organismus entnommenen Geweben und überträgt die daran gemachten Erfahrungen auf das Gewebe im intakten Organismus. Dieser Rückschluß fordert gewisse Voraussetzungen: Das untersuchte Gewebe sollte theoretisch genau so beschaffen sein, wie es das im Organismus war. Um dieses wenigstens annähernd zu erreichen, bedient man sich bestimmter Verfahren, die sich schon von Anfang an — je nach den gestellten Anforderungen — in zwei Richtungen unterscheiden lassen:

Für physiologische bzw. pathophysiologische Untersuchungen muß die „natürliche“ Reaktionsweise des Gewebes erhalten bleiben, es muß also „überlebendes“ Gewebe sein.

Für morphologische bzw. pathologisch-histologische Untersuchungen ist es meistens zweckmäßiger, das Gewebe abzutöten, wobei es aber morphologisch genau so beschaffen sein sollte wie im intakten Organismus. Selbstverständlich könnten morphologische Untersuchungen an sich ebenso gut an überlebenden, unter natürlichen Bedingungen gehaltenen Geweben angestellt werden. Auf dem Gebiet der normalen Histologie stehen diesem Vorgehen auch keinerlei Bedenken entgegen. Anders in der pathologischen Histologie: Hier ist es wichtig, daß z. B. ein Entzündungsprozeß möglichst genau so festgehalten wird, wie er im Moment der Operation, oder bei Sektionsmaterial im Moment des Todes, vorgelegen hat. Der Prozeß sollte nicht weiterschreiten. Das kann nur dadurch erreicht werden, daß man das Gewebe rasch fixiert.

Es ist schwierig, ein Gewebe so zu fixieren, daß es möglichst wenig Artefakte aufweist. Noch schwieriger ist es aber, für unfixiertes Gewebe Bedingungen zu schaffen, unter welchen keine „funktionellen“ Artefakte, wie z. B. hydropische Quellung, auftreten. Es ist erstaunlich, welchen Bedingungen ein Gewebe bei der Fixierung ausgesetzt wird. Man kann Gewebe in Formol kochen, man kann sogar Schnitte veraschen, und die Zellstrukturen bleiben noch deutlich erkennbar. Auf der anderen Seite reagieren lebende Zellen sehr fein auf jede geringste Milieuänderung. Man denke z. B. an die rapiden Gewebsalterationen, die bei Anoxämie auftreten.

Im Falle der Schnell Diagnosen muß bedacht werden, daß hierbei nicht das Weiterschreiten pathologischer Prozesse die Fixierung nötig macht, da ja die Zeitspanne von der Entnahme des Gewebes bis zum fertigen Präparat ohnehin kurz ist. Die Fixierung kann also in diesem Falle an sich in jedem beliebigen Zeitpunkt vorgenommen werden, doch muß dann dafür gesorgt sein, daß nicht die vorgängig der Fixierung oder ohne Fixierung vorgenommenen Behandlungen am Gewebe unerwünschte Veränderungen setzen. Insbesondere wird das Vermeiden wässriger hypotonischer Lösungen bei der Behandlung unfixierter Gewebe oft nicht beachtet, wodurch unter Umständen schwere Veränderungen wie Hämolyse, hydropische Quellung usw. verursacht werden könnten.

Kunstprodukte lassen sich bei der Fixierung nicht vermeiden. Sie sind aber meistens nicht sehr schwerwiegend. Übrigens sind auch bei anderen Behandlungsphasen gewisse Artefakte bekannt. Das Auftreten von solchen braucht nicht immer unbedingt irreführend zu sein: So nimmt man z. B. an, daß die sogenannten Gumprechtschen Schollen in der Blutuntersuchung bei leukämischer Lymphadenose Artefakte seien, entstanden durch das Ausstreichen besonders fragiler Zellen. Diese stellen aber einerseits ein willkommenes Diagnostikum dar, andererseits liefern sie einen Indizienbeweis für die an intakten Zellen ja nicht zum Ausdruck kommende gesteigerte Lädierbarkeit. Auf ein ähnliches Faktum weist ROMEIS bei der Erwähnung der sogenannten „maskierten Strukturen“ hin (8).

Bekanntermaßen immer wieder in gleicher Form auftretende Kunstprodukte können in Kauf genommen werden, sofern man sie als solche erkennt. Durch parallele Untersuchung nach zwei grundlegend verschiedenen Verfahren kann man sich eine Kontrolle über allfällige Kunstprodukte verschaffen, indem man damit rechnen darf, daß nicht bei beiden Verfahren dieselben Artefakte auftreten. Auf diesem Prinzip beruht auch das Nißlsche Äquivalentpräparat (9).

Streng genommen ist übrigens jede Färbung ein allerdings beabsichtigtes und beurteilbares Kunstprodukt.

Zusammenfassend stellen wir also fest, daß wir nur jene Kunstprodukte, diese aber unter allen Umständen vermeiden müssen, die nicht auf irgendeine Weise unserer Kontrolle unterworfen werden können, das heißt nicht als solche erkannt werden. Es ist deshalb gerade bei Schnell Diagnosen vielleicht eher eine mangelhafte, ihren Zweck nicht ganz erfüllende Fixierung zu wählen, als eine in kurzer Zeit forcierte und radikale. Die Fixierung kann unter entsprechenden Kautelen sogar weggelassen werden. An Nachteilen würde das mit sich bringen: Unerwünschtes Fortschreiten pathologischer Prozesse, Auftreten von Kunstprodukten bei anderen Behandlungsphasen, schlechtere Behandlungsmöglichkeiten, schlechtere Färbbarkeit und verminderte Resistenz des Gewebes. Diese Nachteile lassen sich zum Teil ausgleichen: Bei der kurzen Dauer der Schnellverfahren fällt der erstgenannte nicht in Be-

tracht. Übrigens bedeutet das Gefrieren, wie es für das Schneiden frischer Gewebe nötig ist, eigentlich auch eine Fixierung, und zwar, da das Gefrieren dabei rasch erfolgt, eine sehr schonende. Diese Fixierung ist allerdings keine dauernde, sondern eine „reversible“. Der zweite Nachteil, das Auftreten von Kunstprodukten bei anderen Behandlungsphasen, muß und kann durch geeignete Maßnahmen vermieden werden. Um der schlechteren Behandlungsmöglichkeit, Färbbarkeit und Resistenz des unfixierten Gewebes zu begegnen, lassen sich bestimmte technische Einrichtungen, wie sie weiter unten beschrieben werden, anwenden.

Die Vorteile, die dem gegenüberstehen, sind evident. Man wird deshalb gerne auf diese Behandlungsphase verzichten.

Was die Anwendung heißer Fixierungsflüssigkeiten betrifft, so ist von dieser Methode aus den oben erwähnten Gründen eher abzuraten, besonders wenn nach einem einzigen Verfahren gearbeitet wird (3).

Die Anwendung stärker konzentrierter Fixativa kommt praktisch nicht zur Anwendung, da sie eine ungleichmäßige, das heißt schlechte Härtung verursacht.

Das beste Verfahren ist wohl das Fixieren der Schnitte oder in geeigneten Fällen der Ausstriche. Das Fixativum hat nicht eine relativ dicke Gewebsscheibe zu durchdringen, sondern einen dünnen Schnitt. Dieses Verfahren erfordert nur gewisse technische Einrichtungen. Besonders geeignet ist zu diesem Zweck das Fixieren in Formol- oder Osmiumtetroxyd-Dämpfen (10).

Bei der Fixierungsphase kann eventuell eine Fixierung weggelassen werden. Eine Härtung in heißen Lösungen scheint das einfachste, die Fixierung der Schnitte jedoch das beste Verfahren.

2. Abkürzungsmöglichkeiten beim Schneideverfahren

Das Weglassen wird hier nur dann möglich sein, wenn sich Ausstrich- oder Zupfpräparate herstellen lassen. Die Beurteilung solcher Präparate stößt jedoch auf sehr erhebliche Schwierigkeiten. Das Herstellen von Schnitten mit dem Mikrotom ist die Phase, die sich am wenigsten abkürzen läßt: Während die Minimalzeit für das Fixieren etwa 5 bis 10 Sekunden, für das Färben etwa 30 Sekunden beträgt, ist sie für das Mikrotomschneiden mit etwa 2 Minuten anzugeben. Als originellste Schnellmethode, die sehr kurze Zeit erfordert, ist das Terrysche Verfahren zu nennen, bei welchem das Mikrotomschneiden durch Schneiden „von Hand“ mittels eines Rasiermessers ersetzt wird. Das Gefrierschneiden hat den Nachteil, daß es relativ viel Zeit beansprucht.

3. Abkürzungsmöglichkeiten beim Färben

Auch eine Färbung kann ganz weggelassen werden. Nur ungern wird jedoch darauf verzichtet, trotz aller möglichen Hilfsmittel, die angegeben werden und die immer nur einen Hell-Dunkel-Kontrast liefern.

Die Färbung in erwärmten Farblösungen kann bei fixiertem Material unbedenklich angewandt werden. Die Farblösungen sollen isotonisch sein, eventuell müssen sie mit Fixativa versehen werden.

Die Anwendung stärker konzentrierter Farbstoffe kommt aus technischen Gründen nur in beschränktem Maße in Betracht: Bei hoher Konzentration fällt oft der Farbstoff aus, besonders bei höheren Temperaturen. Dadurch entstehen sedimentbestäubte Präparate. Die Färbekraft konzentrierter Lösungen ist außerdem nicht in wesentlichem Ausmaß gesteigert.

Es gibt spezielle Farbstoffe, welche auf Grund ihrer chemischen Eigenschaften rasch färben. Entweder diffundiert das Lösungsmittel besonders rasch in das Gewebe, oder der Farbstoff selbst besitzt eine ausgesprochene Affinität zu den Gewebeelementen.

Eine Abkürzungsmöglichkeit besteht darin, daß die Schnittpräparate in die Farblösung direkt eingebracht werden, ohne aufgeklebt zu werden (sogenannte flottierende Färbung).

Das Weglassen der Färbung ist kaum je empfehlenswert.

Alle übrigen Abkürzungen, wie durch erwärmte, konzentrierte, rasch färbende Farbstoffe oder auch sogenannte flottierende Färbung können kombiniert werden.

4. Der Einschuß

Für den Einschuß der Präparate ist keine Abkürzung notwendig, da die einwandfreie Einbettung in ein Medium wie Kanadabalsam oder dergleichen meistens sehr wenig Zeit beansprucht. Für bestimmte Zwecke stehen auch wasserlösliche Einschußmittel, z. B. Glycerin-Gelatine, zur Verfügung.

Im folgenden sollen einige Schnellverfahren kurz dargestellt werden. Am wenigsten von der Standardmethode abweichend sind die folgenden Verfahren:

Kochmethode nach WALZ

Vom Untersuchungsmaterial werden 1–2 mm dicke Stückchen zugeschnitten, 1–2 Minuten in Formollösung 1:4 gekocht und dann mit dem Gefriermikrotom 10–15 μ dicke Schnitte hergestellt. In seiner Veröffentlichung hebt WALZ (13) die hervorragende Schneidfähigkeit und die gute Färbbarkeit nach den üblichen Methoden, insbesondere der Fettfärbung mit Sudan, hervor. Weiter wird betont, daß Bedenken vor Überhitzung nicht zu Recht bestehen würden und daß die Kernfärbung fast so gut gelinge wie bei langsamer Formalinfixierung. Als Dauer für den ganzen Prozeß sind etwa 3–5 Minuten, nach anderen Autoren 5–10 Minuten anzusetzen; es kommt dabei stark auf die Art der Färbung an. Begnügt man sich damit, die Schnitte ungefärbt auf den Objektträger zu bringen und von der Seite her Farbstoffe wie Methylenblau oder Neutralrot unter das Deckglas fließen zu lassen, so geht der Vorgang natürlich rascher als bei den üblichen Anforderungen mit Hämatoxylin, Gegenfärbung, Entwässerung und Einschließen in Balsam. Eine Färbung auf dem Objektträger mit Hämalaun und nachfolgendem Einschluß in Glycerin wurde von GIOIA angegeben.

Die Kritik dieses Verfahrens betrifft hauptsächlich die energische Fixierung, mit der Gefahr dadurch bedingter Kunstprodukte (3).

Eine bedeutende Verbesserung dieses Verfahrens in sachlicher Hinsicht, die allerdings mit einer Komplizierung der technischen Einrichtungen erkaufte werden muß, ist die Einführung des Messertiefkühlers nach SCHULTZ-BRAUNS (12). Hiermit gelingt es, tadellose 10- μ -Schnitte von unfixiertem Material herzustellen und weiterzubehandeln. Das Verfahren arbeitet, wenigstens in seiner Originalform, kaum schneller als die Kochmethode, dafür ist es aber einwandfreier und eliminiert das Erhitzen des Materials. Auf Technik und Modifikationen wird später noch näher eingegangen.

Andere Verfahren

Ein ähnliches, noch rascheres Verfahren ist die Methode nach WILSON, welche jedoch für höhere Ansprüche nicht voll genügt und technische Schwierigkeiten bietet. Hierbei wird das frische Material in Dextrinlösung gefroren, geschnitten, mit Methylenblau gefärbt und in Glukose-Glycerin-Mischung eingeschlossen. Die Dauer wird mit 1½ Minuten angegeben.

Alle Gefrierschnittmethoden trifft der Vorwurf der doch mehr oder weniger langen Dauer. Dieser Faktor wäre, wie schon oben angedeutet, nicht so schwerwiegend, sondern es ist vielmehr die Kompliziertheit der Apparatur, die es kaum gestattet, das Verfahren im oder neben dem Operationssaal selbst durchzuführen. Das bedeutet dann wieder einen zusätzlichen Zeitverlust für den Transport des Materials in ein histo-pathologisches Laboratorium und die Übermittlung des Berichtes an den Chirurgen. Die Zusammenarbeit von Operateur und Pathologen wird dadurch etwas behindert. Als einziges wirksames Verfahren, welches diese Schwierigkeiten überwindet, kommt das Verfahren nach TERRY in Frage. Im deutschen Sprachgebiet wurde es besonders durch CHRISTELLER und LAAS empfohlen und eingeführt. In seiner Publikation (2) setzt CHRISTELLER die Dauer der Gefrierschnittverfahren bedeutend höher an als andere Autoren. Für die Beurteilung der Methode ist die Zeit von dem Moment, in welchem der Untersucher das Material in die Hand bekommt, bis zu dem Moment, wo das Präparat im Mikroskop betrachtet werden kann, maßgebend. CHRISTELLER sagt: „Wie man sieht, ist man über die Grenze einer 5–10 Minuten langen Untersuchungszeit nicht hinausgekommen...“ Das Terrysche Verfahren liefert dagegen „in weniger als einer Minute prachtvolle Schnittbilder...“

Es ist zu betonen, daß der wichtigste Faktor bei diesem Verfahren die Übung ist. ROULET (11) weist darauf hin, daß das Verfahren nur bei großer Übung brauchbar sei, dann allerdings in ½–1 Minute eine Diagnose ermögliche. Das Verfahren wird von CHRISTELLER folgendermaßen angegeben:

„Man schneidet aus der frischen Exzision ein möglichst geradflächiges, bis zu 1 cm großes Stück aus und heftet es mit zwei Nadeln auf einer Korkplatte an. Nun schneidet man mit einem befeuchteten Rasiermesser aus dem Stück mittels zweier langer Messerzüge eine möglichst planparallele, etwa 1 mm dünne Scheibe aus, legt sie von der Messerklinge auf den Objektträger und benetzt sie mit einigen Tropfen Wasser aus einer Messerpipette. Die Oberfläche der an dem senkrecht gehaltenen Objektträger haftenden Scheibe wird nun mit sanft angelegtem, feinem Pinsel mit der Farblösung (neutrales polychromes Methylenblau nach TERRY) bestrichen... Unmittelbar danach spült man mit der gleichen Tropicpipette einige Wassertropfen nach, legt ein Deckglas auf und betrachtet das Präparat sofort in einem Mikroskop, das mit einer kräftigen Halbwattlampe beleuchtet wird.“

Man ist dann höchst erstaunt, da man glauben muß, das Bild eines vollendet dünnen, mit dem Mikrotom hergestellten Schnittes vor sich zu haben. Die Scheibe wirkt in der Tat als solcher, zumal die polychrome Methylenblaufärbung eine prachtvolle dunkelblaue Kernfärbung mit scharfem Kontrast der rosaroten plasmatischen Substanzen bewirkt. Dieser Eindruck kommt dadurch zustande, daß nur die Oberfläche der Scheibe durch das Bepinseln Farbstoff angenommen hat, die Masse des Gewebes dagegen ungefärbt bleibt und genug Licht hindurch läßt, wobei sie dieses zerstreut und wie eine untergelegte Mattscheibe wirkt.“

So hergestellte Präparate kann man 5—10 Minuten lang untersuchen, bis sie durch allmähliche Diffusion des Farbstoffes in die Tiefe unbrauchbar werden.

„Was die technische Ausführung betrifft, so kann man in der Tat in 30—40 Sekunden meist eine Diagnose stellen... Es ist also möglich, ... schnell hintereinander mehrere Stellen zu untersuchen.“

„Schwierigkeiten entstehen nur selten bei sehr mürbem Gewebe... oder bei hämorrhagisch infarziertem Gewebe, das schwer durchscheinend wird.“

Instrumentarium: Rasiermesser, Korkplatte, Nadeln, Wasserglas mit Pipette, Farblösung mit Pinsel, Objektträger, Deckgläschen, Mikroskop.

Bei zu dicken Schnitten oder bei aus anderen Gründen zu wenig lichtdurchlässigem Gewebe besteht die Möglichkeit, die Präparate im Auflicht mittels Ultropak bzw. Opakilluminator zu betrachten, was allerdings ihre Deutlichkeit infolge von Reflexen etwas beeinträchtigt. Die Beurteilung ist dadurch etwas erschwert, da ein ungewohntes Bild entsteht.

Das Verfahren erfordert eine große Übung. Bröckeliges Gewebe und stark hämorrhagisch durchtränktes Material eignet sich nicht, auch kleine Probeexzisate, z. B. aus den Stimmbändern u. dgl., sind ungeeignet.

Eine Mittelstellung zwischen dem Terryschen und dem Gefrierverfahren nimmt die von KLEIN und KRUTINA angegebene Methode ein. Teils wird mit Gefrierschnitten, teils mit Doppelmesser- oder Rasiermesserschnitten gearbeitet. Eigentümlich ist für diese Methode die Anwendung von FEYRTERS Thionin-Weinsteinsäuregemisch, welches noch in sehr starker Verdünnung unfixiertes Gewebe intensiv und trotzdem sehr different zu färben vermag. Das Vorgehen ist folgendes: „Der unfixierte Gefrierschnitt wird auf den Objektträger gebracht, mit Aqua destillata eben, aber vollkommen bedeckt. Dann lassen wir einen Tropfen der verdünnten Lösung auftropfen und schließen nach etwa 5 Sekunden mit einem Deckglas ab. Der Schnitt kann sofort mikroskopisch untersucht werden.“ Als besonderer Vorteil wird noch hervorgehoben, daß bei dem Verfahren der Färbevorgang als solcher beobachtet werden kann. Das nicht unbedenkliche Bedecken des unfixierten Schnittes mit Aqua destillata wird dadurch kompensiert, daß die Verfasser parallel mit jedem unfixierten Schnitt einen zweiten mit Osmiumsäure fixieren und diesen färberisch gleich behandeln. Allerdings wird dadurch der besondere Vorteil des Verfahrens bis zu einem gewissen Grad in Zweifel gezogen. Das Verfahren soll sich besonders zur Beurteilung von Granulationsgewebe eignen. Weiter heißt es: „Auch Knochenmark- sowie Milz- und Lymphknotenausstriche und Zupfpräparate ergeben sehr klare Bilder.“ Als Nachteil wird von den Verfassern selbst die begrenzte Haltbarkeit erwähnt, indem die Präparate diffus nachdunkeln.

LAAS (6), der für das Terrysche Verfahren eintritt und es leicht modifiziert, schreibt: „Das von KLEIN und KRUTINA mitgeteilte Verfahren ist eine Abänderung des von TERRY angegebenen. Eine Verbesserung ist diese Abänderung nicht. Bei einem Vergleich schneidet vielmehr das Terrysche Verfahren besser ab.“

LAAS empfiehlt folgendes Vorgehen: „1. Möglichst planparalleles Gewebsstück mit Rasierklinge zurechtschneiden, so dünn, wie es die Konsistenz zuläßt. 2. Stück an einer Ecke mit breiter anatomischer Pinzette fassen. 3. Über die nahezu senkrecht gehaltene Schnittfläche einen Tropfen Unnasches polychromes Methylenblau laufen lassen. 4. Sogleich in Leitungswasser abspülen. 5. Stück mit der gefärbten Fläche nach oben auf ein Deckglas legen. 6. Mit Durchlicht oder schrägem Auflicht beleuchten.“ Wichtig ist wohl noch die Bemerkung, daß der Beleuchtungsquelle, am zweckmäßigsten Niedervoltlampe, ein Wärmeschutzglas vorgeschaltet werden muß, „weil sonst die Färbung fast augenblicklich vergeht“. Die Färbung hat den Nachteil, daß sie schon nach einer Minute abzublassen beginnt und verwaschen erscheint. Ungeeignet ist sehr weiches, unfixiertes Gewebe, wenig geeignet ist Lunge und Milz.

Einige Verfahren verzichten überhaupt auf jegliches Schneiden. Sie verwenden Ausstriche, Aufschwemmungen, Zupfpräparate und ähnliches. Diese Verfahren sind immerhin die einzigen, die zeitlich mit dem Terryschen Verfahren konkurrieren können. In einigen beschränkten Fällen können sie als das Verfahren der Wahl oder gar als einzige in Frage kommende Methode betrachtet werden. Dies ist z. B. bei Blutaussstrichen der Fall, die allerdings wohl kaum je zur Schnelldiagnose gebraucht werden. In der großen Mehrzahl der Fälle ist aber mit diesen Methoden nicht viel zu erreichen. Zwar gelingt es fast immer, einen Ausstrich zu gewinnen, jedoch stößt man bei der Beurteilung meistens auf fast unüberwindbare Schwierigkeiten. Das hat seine Ursache allerdings darin, daß die Untersuchung iso-

lierter Zellen, z. B. in Ausstrichen, im allgemeinen eine starke Vernachlässigung erfahren hat. Diese älteste Methode wurde durch die Schnitverfahren fast völlig verdrängt. Deshalb fehlt es an der nötigen Vertrautheit mit den Bildern, welche Ausstrichpräparate liefern. Eine Ausnahme bildet das Blut, bei welchem die Herstellung von Ausstrichen das adäquate Verfahren ist.

Der Hauptvorteil der Ausstrichverfahren beruht auf dem geringen Zeitaufwand, der wesentlichste prinzipielle Nachteil auf dem Fehlen des natürlichen Zellzusammenhangs, dem Wegfall der Beurteilbarkeit infiltrativen Wachstums usw.

v. WALSEM hat ein derartiges Verfahren angegeben: Er untersucht abgeschabtes Zellmaterial, welches auf dem Objektträger mit Azur-II-Giemsa gefärbt wurde. CHRISTELLER meint dazu: „Es braucht nicht gesagt zu werden, wie unvollkommen der Wert der Untersuchung solcher isolierter Zellen sein muß.“ Bei der Beurteilung kommt es auch hier wieder auf den Standpunkt an und auf die Frage, ein wie großes Gebiet man dem Verfahren einräumen will. Auch hier ist die Kardinalfrage, ob man mit einem einzigen Verfahren auskommen will oder ob man für jeden Einzelfall das geeignetste Mittel wählt, wie es in der Einleitung angedeutet wurde. Trifft letzteres zu, so hat die Beiziehung von Ausstrichen in geeigneten Fällen sicher ihre volle Berechtigung.

Im Pathologischen Institut der Universität Basel wird so vorgegangen, daß — von besonderen Fällen abgesehen — routinemäßig Gefrierschnitte nach der Formolkochmethode hergestellt und einer Hämalaun-Eosin-Schnellfärbung unterzogen werden. Die Schnellpräparate werden gegebenenfalls von mehreren Untersuchern gleichzeitig beurteilt und das Resultat in einem telefonischen Bericht abgegeben. Bei unsicherer Diagnose wird dem Einsender empfohlen, den definitiven Bericht abzuwarten. Dieser wird auf das in jedem Fall parallel hergestellte Standardpräparat abgestellt und erst dann schriftlich fixiert. Zur Kontrolle der Resultate werden jeweils Standardpräparate mit dem Schnellpräparat verglichen.

Was die Stellungnahme zur Schnelldiagnose überhaupt betrifft, so ist für den Kliniker in erster Linie die Frage nach der Zuverlässigkeit der Diagnosen wichtig. Er soll wissen, wie groß der Prozentsatz von Versagern ist, um abwägen zu können, ob es sich lohnt, die für den Patienten aus der Schnelldiagnose erwachsenden Nachteile in Kauf zu nehmen. Nur zu oft kann dem Chirurgen vom Pathologen aus methodischer Unzulänglichkeit kein bestimmter Bescheid zugestellt werden.

Untersuchungen über die Eignung zweier neuerer Verfahren zur histologischen Schnelldiagnose

Die Phasenkontrastmikroskopie

Man versteht darunter ein optisches Verfahren, welches dazu dient, kontrastarme, z. B. völlig durchsichtige mikroskopische Objekte zu kontrastreicher Darstellung zu bringen.

Mit der Anwendung der Phasenkontrastmikroskopie für histologische Untersuchungen hat sich unter anderem besonders v. ALBERTINI (1) beschäftigt. Er sagt darüber: „Als überragenden Vorteil des neuen Verfahrens haben wir die grundlegende Änderung der Voraussetzungen für die mikroskopische Untersuchung erkannt, den Wegfall von Fixation und Färbung und damit die Möglichkeit, die unveränderte, überlebende Zelle zu untersuchen.“ Ferner: „Das PKM-Verfahren ist, besonders für die zytologische Untersuchung von Geschwülsten, der Schnitt-Färbe-Technik überlegen.“ Außerdem sei hier gleich gesagt, daß v. ALBERTINI eigentlich ganz dazu übergegangen ist, Zellaufschwemmungen und keine Schnitte zu verwenden. Man sollte also denken, das Verfahren müsse sich ganz besonders zur histologischen Schnelldiagnostik eignen, würde es doch den Wegfall von Fixierung, Schneiden, Färben und Einschließen bedeuten. Zudem wird uns ein unverfälschtes Bild der Körperzellen versprochen.

Bevor nun auf die Kritik eingegangen werden soll, sei hier das Prinzip des Verfahrens dargestellt:

Schon seit langem sind ähnliche optische Verfahren bekannt, mit denen es gelingt, selbst solche Objekte sichtbar zu machen, welche theoretisch wegen fehlender oder an allen Stellen gleichmäßiger Absorption vollständig unsichtbar sein müßten, die in Wirklichkeit aber aus bestimmten Gründen nie absolut unsichtbar sind, und zwar auch ohne besondere Einrichtung. Allen diesen bisher bekannten Verfahren haftete jedoch der Fehler an, daß sie ein nicht vollkommen getreues Abbild des Objektes lieferten; so wurden im besonderen kleinere Flächenverhältnisse, die Intensitätsverteilung und die Konturen mehr oder weniger entstellt.

Mit der Phasenkontrastmikroskopie ist uns dagegen ein Verfahren in die Hand gegeben, welches gestattet, nicht oder wenig absorbierende Objekte praktisch vollständig flächentreu und mit scharfem Randkontrast zur Darstellung zu bringen.

Das Verfahren stammt von dem holländischen Physiker ZERNIKE (14). 1935 veröffentlichte er in der Zeitschrift für technische Physik die Resultate, die er dadurch gewonnen hatte, daß er die Abbesche bzw. Rayleighsche Theorie der Bildentstehung im Mikroskop sowie die Wellentheorie des Lichtes auf vollkommen durchsichtige Körper rechnerisch anwandte. Es ergab sich die Möglichkeit, vollkommen durchsichtige Objekte, die den durchtretenden Lichtwellen nur Phasen-, aber keine Amplitudenänderungen erteilen, im Mikroskop sichtbar zu machen.

Über die Vorzüge des neuen Verfahrens wurde schon gesprochen. Im Hinblick auf die Schnelldiagnose interessierte darunter besonders der Wegfall von Fixierung, Färbung und eventuell dem Schneiden, jener zeitraubenden Prozeduren, welche die Möglichkeit von Kunstprodukten in sich schließen.

Auch da sind Bedenken geäußert worden. v. ALBERTINI sagt selbst: „Die Schwierigkeiten bestehen darin, daß der ungeübte Untersucher das, was er sieht, nicht interpretieren kann.“ Dieser Ausspruch, der für die Verhältnisse der rein wissenschaftlichen Forschung geprägt ist, wird besonders auffallend, wenn es sich um Schnelldiagnosen handelt. Man hat sozusagen nichts mehr in der Hand, was man als Maßstab für die Beurteilung der vorliegenden Zellen anlegen könnte. Keine Färbung, kein Zellverband, nicht einmal die Zellform erscheint in gewohnter Weise. Die unfixierten Zellen verändern sich im flüssigen Milieu rasch. Ich erinnere hier nochmals an die Bemerkung CHRISTELLERs zu dem von Walsenschen Verfahren: „Es braucht nicht gesagt zu werden, wie unvollkommen der Wert der Untersuchung ‚isolierter Zellen‘ sein muß.“

Zu diesen allerdings nicht prinzipiellen, sondern mehr die fehlende Erfahrung betreffenden Einwänden kommt noch die Schwierigkeit der Herstellung brauchbarer Ausstrichpräparate. Es bleibt noch die Herstellung von Zupfpräparaten oder ähnlichem übrig, wodurch aber die unfixierten Zellen eventuell starke Läsionen erleiden. Dieser Vorwurf trifft allerdings auch unter Umständen Schnitte von unfixiertem Material, es fragt sich, welche Prozedur stärkere Alterationen verursacht. Schnitte eignen sich übrigens erfahrungsgemäß im allgemeinen schlechter zur Phasenkontrastmikroskopie. Ein weiterer Nachteil der Phasenkontrastmikroskopie ist der, daß dabei die Präparate von mehreren Untersuchern nicht gleichzeitig beurteilt werden können, wie dies bei histologischen Schnitten möglich ist.

Im konkreten Fall der Tumordiagnostik bringt die Untersuchung von Zellaufschwemmungen gleichzeitig einen Vorteil und einen Nachteil gegenüber der Schnittuntersuchung mit sich. Der Nachteil ist, daß der Zellverband nicht studiert werden kann, daß der Übergang von normalem zu pathologisch verändertem Gewebe und ein allfälliges autochthones Wachstum nicht beurteilt werden kann. Dafür hat aber andererseits v. ALBERTINI (1) interessante, für maligne Tumoren charakteristische, wenn nicht sogar spezifische Merkmale feststellen können, welche an Schnitten nicht zum Ausdruck kommen. Z. B. findet man in solchen Präparaten viele nackte Kerne, welche auf eine Lockerung bzw. Auflösung des Zytoplasmas hinweisen. v. ALBERTINI (1) äußert die Meinung, daß bei der „Verkrebung“ der Zellen an sichtbaren Vorgängen die Zytoplasmolyse als degenerativer Vorgang im Vordergrund stehe, während die Veränderungen des Zellkerns sekundärer Natur seien. Für diesen Fall wäre es folglich besser, Aufschwemmungen statt Schnitte zu untersuchen, an welchen die sekundären Kernveränderungen beurteilt werden können. Über diese Fragen läßt sich noch kein abschließendes Urteil fällen.

Wichtig mag noch die an Hand von phasenmikroskopischen Untersuchungen gemachte Feststellung sein, daß Fixationsflüssigkeiten die Zellen und besonders die Zellkerne stark verändern.

Die an der Phasenkontrastmikroskopie geübte Kritik bezieht sich lediglich auf deren Anwendung als histologisches Schnellverfahren. Es muß zugegeben werden, daß die meisten Einwände nur auf Grund ungenügender Vertrautheit mit dem neuen Verfahren gemacht wurden.

ZOLLINGER (16) sagt: „Wir müssen uns im klaren sein darüber, daß die Arbeit mit dem Phasenkontrastmikroskop anfänglich, besonders für den pathologischen Anatomen, einem Suchen in Neuland gleichkommt.“ Wir wissen zunächst nicht nur nicht, wie die verschiedenen Zellen im ungefärbten, unfixierten Aufschwemmungs- oder Ausstrichpräparat im Phasenkontrastmikroskop aussehen, sondern wir kennen auch nicht die Veränderungen, die sie durchmachen durch verschiedene thermische, chemische, mechanische Einflüsse, ebensowenig sind wir über die Grenzen des „Normalen“ bei ihnen orientiert.

Die Phasenkontrastmikroskopie hat, jedenfalls als alleiniges Verfahren, in der histologischen Schnelldiagnostik vorläufig noch nicht Eingang gefunden. Es wäre allenfalls die Eignung als Zusatz- bzw. Kontrollverfahren zu solchen Methoden in Erwägung zu ziehen, bei welchen mit Kunstprodukten gerechnet werden muß. Aber selbst hierzu wird die Verwendung schwierig sein, weil das Bild im Phasenkontrastmikroskop grundsätzlich verschieden ist von gefärbten Schnitten, so daß ein Vergleich fast unmöglich ist. Es wird jedoch bei dauernder Übung mit diesem Verfahren möglich sein, die Phasenkontrastmikroskopie zu einem unentbehrlichen Hilfsmittel für die Schnelldiagnose zu entwickeln.

Die Färbung nach PAPANICOLAOU

Entstehung: Im Verlauf des letzten Jahrzehntes haben sich besonders amerikanische Autoren mit dem Studium der Beschaffenheit des Vaginalsekretes während verschiedener Zyklusphasen bei Krankheiten des hormonalen Systems und des weiblichen Genitaltraktes eingehend befaßt. Im Zusammenhang mit diesem Studium wurden gewisse Untersuchungstechniken, insbesondere Färbeverfahren, entwickelt. PAPANICOLAOU (7) arbeitete ein solches Verfahren aus, und es erwies sich, daß sich dieses speziell auch zur Tumorfürhdiagnostik des weiblichen Genitaltraktes eignete. Später wurde das Verfahren auch für die Diagnose von Tumoren anderer Organe bzw. Organsysteme angewandt.

Die von PAPANICOLAOU angegebene Methode beruht darauf, mit Hilfe verschiedener Farbstoffe in einem Zellausstrich die für maligne Tumoren charakteristischen Zellen möglichst weitgehend zu differenzieren. JOEL (4) erwähnt: „Es ging darum, eine besonders gute Kern- und eine helltransparente Zytoplasmafärbung herzustellen... Eine derartige Färbvorschrift, die hauptsächlich für die Ca.-Diagnostik unerläßlich ist, hat PAPANICOLAOU angegeben.“

Das Originalverfahren, das mit Ausstrichen arbeitet, wurde später noch weiter ausgedehnt: „In den letzten Jahren fand die Methode auch Eingang in die Diagnostik all derjenigen Tumoren, bei denen es gelingt, Abstrichmaterial mit typischen Zellen zu gewinnen. Zu erwähnen sind hier vor allem Tumoren des Darmtraktes, des Magens, der Mundhöhle, des Kehlkopfes, der Bronchien, der Harnblase und Prostata sowie Hauttumoren.

Es wurde nun versucht, das Verfahren noch weiter auszudehnen, nämlich es auch auf Operationsmaterial anzuwenden, zweitens auch histologische Schnitte dieser Färbung zu unterziehen und schließlich das Verfahren zu einer Schnellmethode zu modifizieren, da es dazu besonders geeignet erschien.

Weil das Originalverfahren aber im Minimum 25—30 Minuten beansprucht, vom Mikrotom bzw. Ausstrich bis zum Einschluß gerechnet, wurden verschiedene Abkürzungen notwendig. Diese Abkürzungen haben sich auf die Fixierung, die Färbung und die Vorbereitung zum Einschluß erstreckt.

Die Herstellung und Verarbeitung der Schnitte wurde ganz in Anlehnung an das Schultz-Braunssche Verfahren durchgeführt, da dieses sehr rasch arbeitet und die meisten Möglichkeiten offen läßt.

Die notwendigen Abkürzungen wurden dadurch zu erreichen versucht, daß nicht das Material im Block oder im Scheibchen, sondern erst der Gefrierschnitt flottierend fixiert wurde. Hierzu war eine leichte Modifikation des Schultz-Braunsschen Verfahrens notwendig: Anstatt die Schnitte vom Messer weg auf Objektträger aufzuziehen, wurde dicht neben dem Gefriertisch ein Gefäß angebracht, welches die Schnitte jeweils vom Gefriermesser direkt auffängt. Das Gefäß wurde mit einer Formalinlösung 1 : 4 gefüllt. Unter den vielen Variationen, die SCHULTZ-BRAUNS für die Schnittbehandlung angibt, wird auch die direkte Färbung unfixierter Schnitte erwähnt. Ein solches Vorgehen läßt sich unter entsprechenden Kautelen ohne weiteres rechtfertigen, nämlich wenn es gelingt, die Flüssigkeiten, mit welchen der unfixierte Schnitt in Berührung kommen muß, entweder annähernd gewebisisotonisch zu machen oder mit einem Fixierungsmittel zu versetzen. Für den eingeschlagenen Weg der flottierenden Weiterbehandlung des Schnittes wurde es notwendig, ein Fixierungsmittel beizumischen, um zu verhüten, daß die Schnitte miteinander verkleben.

PAPANICOLAOU hat als Fixierungsmittel Alkohol-Äther vorgeschlagen. Statt dessen wurde für die vorliegenden Methoden Formol 1 : 4 verwendet. Nachteile für die Färberegebnisse konnten dabei nicht festgestellt werden.

Zur Abkürzung der Färbung wurde außer der flottierenden Behandlung der Schnitte auch eine Erwärmung der Farbstoffe vorgenommen.

Die im Originalverfahren 5—15 Minuten dauernde Einschlußvorbereitung konnte ohne nachteilige Folgen abgekürzt werden. Anstelle von Alkohol-Xylol wurde Karbol-Xylol verwendet.

Auf diese Weise wurde es möglich, Schnellpräparate innert 10 Minuten fertigzustellen, gerechnet vom Erhalt des Gewebes bis zum fertigen Schnittpräparat. Bei Übung der Technik kann die Prozedur auf 7 Minuten reduziert werden.

Beiträge zu Fragen technischer Art auf dem Gebiet der histologischen Schnelldiagnostik

Der Erfolg histologischer Schnellverfahren hängt nicht zuletzt davon ab, wie die technische Einrichtung beschaffen ist. Es ist selbstverständlich, daß von allen Apparaten ein einwandfreies, zuverlässiges Arbeiten gefordert wird und daß sie möglichst praktisch ausgestaltet seien, was wiederum eine nicht unbeträchtliche Zeiteinsparung bedeutet.

Zunächst sei auf die Gefrierschnittverfahren eingegangen. Was einmal das Zuschneiden des Blockes für das Mikrotom betrifft, so mag für viele Fälle, besonders wenn es sich um unfixiertes Material handelt, die Anwendung eines Doppelmessers angezeigt sein. Dadurch wird eine rasche und schonende Herstellung von 2—3 mm dicken Scheibchen ermöglicht, die sich rasch durchfrieren und schnell anschneiden lassen. Ein solches Messer kann z. B. aus zwei Klingen eines Rasierapparates hergestellt werden.

Als Gefriermikrotom ist für unfixiertes Gewebe ein Messertiefkühler nach SCHULTZ-BRAUNS unerläßlich. ZETHRAEUS (15) hat eine zweckmäßige Modifikation angegeben. Hierbei wird das Messer nicht durch einen offenen CO₂-Strom gekühlt, sondern durch eine auf das Messer aufmontierte Büchse, die mit einer Kältemischung gefüllt wird. Die Hauptvorteile dieser Modifikation beruhen darauf, daß das Messer nicht nachgeköhlt zu werden braucht, daß es gleichmäßig tiefgeköhlt bleibt, daß kein zusätzlicher offener CO₂-Strom entsteht, der die warme Zimmerluft in Bewegung setzt und die Kühlehaltung des Systems beeinträchtigt sowie die Eisbildung auf dem Messer fördert.

Eine andere Lösung mit ähnlichem Effekt kann erreicht werden, wenn das Messer mit einer Bohrung und zwei Gewindestutzen versehen wird, so daß das Lumen mit einer

Kühlflüssigkeit durchströmt werden kann. Die Temperatur des ganzen Systems soll konstant bleiben.

Ein Gefriermikrotom soll eine möglichst helle Farbe und einen glatten Anstrich besitzen.

Für das Aufziehen der Schnitte vom Messer weg, wie es SCHULTZ-BRAUNS angibt, oder für das Übertragen in eine Flüssigkeit braucht es eine gewisse Zeit. Durch Anbringen eines mit geeigneter Flüssigkeit gefüllten Behälters direkt am Gefriertisch, berechnet zum Auffangen der Schnitte, kann diese Zeit eingespart werden.

Histologische Schnitte kann man entweder vor dem Färben auf den Objektträger aufziehen und im aufgezogenen Zustand in die Farblösung bringen, oder man kann den Schnitt z. B. mit einem gebogenen Glasstab in die Färbekuvetten und Zwischenflüssigkeiten übertragen und nachträglich erst aufziehen. Durch die letztgenannte flottierende Färbung werden die Schnitte gleichmäßiger, schöner und zugleich rascher gefärbt, da die Farbstoffe und Intermedien von allen Seiten gleichmäßig an das Gewebe herantreten können.

Im allgemeinen lassen sich gut fixierte Schnitte leicht flottierend färben; bei sehr brüchigem, schlecht oder überhaupt unfixiertem Material oder bei sehr kleinen Schnitten ist das schwieriger. Mit Vorteil können die Schnitte auf einem feinen Drahtsieb aus den Lösungen aufgenommen und übertragen werden. Beim Eintauchen in die nächste Flüssigkeit nach vorherigem Abtropfenlassen, eventuell unter Zuhilfenahme von Filtrierpapier, bringt man das Sieb ganz vorsichtig auf die Flüssigkeitsoberfläche, so daß es sich eben benetzt. Nachdem die starken Diffusionsströmungen aufhören, taucht man das Sieb langsam tiefer, so daß sich der Schnitt allmählich abheben kann. Er schwimmt dann meist ausgebreitet auf der Flüssigkeitsoberfläche.

Es wurde auch ein Doppelsieb konstruiert, dessen beide Siebflächen auseinandergezogen und wieder aneinandergelegt werden können, so daß zwischen den beiden Sieben ein Schnitt aufbewahrt werden kann. Der Schnitt wird bei auseinandergezogenen Sieben aufgenommen, nachher werden die Siebe vorsichtig einander genähert bis zur Berührung, und der ganze Apparat so in die verschiedenen Lösungen gebracht, ohne daß man dabei besonders vorsichtig vorgehen muß. Der Schnitt tritt also dabei von beiden Seiten mit der Lösung in Kontakt.

Die Siebe sollen aus chemisch indifferentem Material bestehen.

Es gibt Fälle, wo das zu untersuchende Gewebe so empfindlich ist, daß es sich auf die eben beschriebene Weise nicht behandeln läßt. Dann empfiehlt es sich, die Schnitte genau nach dem Schultz-Braunsschen Verfahren vom Messer weg auf Objektträger aufzuziehen, wobei man aber die Objektträger zuvor mit einer dünnen Schicht von Glycerin-Gelatine versehen hat. Das Gewebe legt sich schön flach dem Objektträger an. Wird dieser darauf in eine etwa 30—40° C warme 4%ige Formollösung gebracht, so löst sich der Schnitt innert kurzer Zeit wieder ab, während er gleichzeitig tadellos faltenfrei fixiert wird. Er verhält sich nun wie ein nach dem gewöhnlichen Gefrierschnittverfahren aus vorfixierten Gewebsblöcken hergestellter Schnitt. Selbst aus Geweben, welche fast keinen Zusammenhang aufweisen und nach der gewöhnlichen Gefrierschnittmethode überhaupt nicht geschnitten werden können, lassen sich auf diese Weise flottierend färbbare Schnitte gewinnen, da das im Gewebe enthaltene Eiweiß beim Schneiden noch nativ ist, in der Formollösung auf dem Objektträger aber zu einer glatten einheitlichen Membran gerinnt, die einen festen Gewebszusammenhalt gewährleistet.

Zusammenfassung

1. Nach kurzer Darstellung des Prinzips und der Problematik der Verfahren für die sogenannte histologische Schnelldiagnose werden die verschiedenen Methoden besprochen. Es wird der Schluß gezogen, Schnell Diagnosen nur nach strenger Indikation zu verwenden. Für die Verwendbarkeit werden Richtlinien angegeben.

2. Das Prinzip der Phasenkontrastmikroskopie wird kurz beschrieben und die Eignung für histologische Schnellverfahren diskutiert.

3. Es werden Modifikationen des Färbeverfahrens nach PAPANICOLAOU angegeben, die ermöglichen sollen, dasselbe auch für die histologische Schnelldiagnostik zu verwenden, insbesondere wird auch auf die bisher nicht übliche Anwendung dieser Färbung auf histologische Schnitte hingewiesen.

4. Technische Einrichtungen werden angegeben, welche zur Herstellung histologischer Schnellschnitte dienlich sein sollen.

Summary

1. After a short presentation of the principles and problems of the procedures employed in the so called rapid histological diagnosis the different methods are discussed. The conclusion is drawn that rapid diagnostic procedures are to be employed only when an urgent indication arises. For the applicability certain guiding directives are given.

2. The principle of Phase Contrast microscopy is briefly described and its suitability for rapid histological technique is discussed.

3. Modifications of the Papanicolaou staining are given which should enable one to employ it in rapid histological diagnosis; especial attention is given to the application of this staining on histological sections, a procedure not usual until now.

4. Technical installations are described for the preparation of rapid histological sections.

Literatur

1. *Albertini A. v.*, Schweiz. Z. Path. u. Bakt. 8 (1945): 298. — Derselbe, Schweiz. Z. Path. u. Bakt. 9 (1946): 701. — Derselbe, Schweiz. Z. Path. u. Bakt. 10 (1947): 4. — Derselbe, Praxis. Schweiz. Rundsch. Med. 35 (1946): 107. — 2. *Christeller E.*, Klin. Wsch. 7 (1928): 448. — 3. *Dreyfus J. R.* und *Scheidegger S.*, Zentralbl. Chir. 65 (1938): 1549. — 4. *Joel Ch. A.*, Acta anatomica 6 (1948): 175. — 5. *Klein H.* und *Krutina U. B.*, Zentralbl. Allg. Path. u. path. Anat. 79 (1942): 353. — 6. *Laas E.*, Zentralbl. Allg. Path. u. path. Anat. 80 (1943): 369. — 7. *Papanicolaou G. N.* und *Traut H. F.*, The Commonwealth Fund 1943. — *Papanicolaou G. N.*, Science 95 (1942): 438. — 8. *Romeis B.*, Mikroskopische Technik. 15. Aufl. (1948): 46. — 9. Derselbe, Mikroskopische Technik. 15. Aufl. (1948): 396 f. — 10. Derselbe, Mikroskopische Technik. 15. Aufl. (1948): 63 und 66. — 11. *Roulet F.*, Methoden der pathologischen Histologie. — 12. *Schultz-Brauns O.*, Zentralbl. Allg. Path. u. path. Anat. 50 (1931): 273. — Derselbe, Klin. Wsch. 9 (1930): 1102 und 10 (1931): 113. — Derselbe, Zentralbl. Allg. Path. u. path. Anat. 54 (1932): 225. — Derselbe, Virch. Arch. I (1929): 273. — 13. *Walz K.*, Zentralbl. Allg. Path. u. path. Anat. 30 (1919): 442. — 14. *Zernike F.*, Z. techn. Physik 16 (1935): 454. — Derselbe, Physika 9 (1942): 686 u. 974. — *Zeiß*, Phasenkontrast-Einrichtung. Mikro G 11-304-1 (Mikro 572). — 15. *Zethraeus S.*, Z. wiss. Mikroskopie u. mikroskop. Technik 54 (1937): 408. — 16. *Zollinger H. U.*, Mikroskopie. Zentralbl. mikroskop. Forsch. u. Methodik 3 (1948): 1.

Die Zeitschrift »MIKROSKOPIE«

ZENTRALBLATT FÜR MIKROSKOPISCHE FORSCHUNG UND METHODIK

bringt: 1. Originalarbeiten erster Fachleute der ganzen Welt aus den verschiedensten Wissensgebieten (Medizin, Biologie, Technik, Industrie), durch reiches, erstklassiges Bildmaterial illustriert. — 2. Kleine Mitteilungen mikroskopisch-methodischen Charakters aus Wissenschaft und Technik. — 3. Referate über die einschlägige Literatur des In- und Auslandes. — 4. Sonderbände über Spezialgebiete mit umfangreicheren Arbeiten, die im Rahmen der normalen Hefte nicht untergebracht werden können.

Jährlich 6 Doppelhefte zu 64 Seiten mit 30 – 40 Abbildungen

INHALT DES FÜNFTEN JAHRGANGES (1950):

BARGMANN W., Die elektive Darstellung einer marklosen diencephalen Bahn (11/12) — BEJDL W., Über die Beeinflussung der Reifung des Delafieldschen Hämatoxylingemisches durch Ultraschall (1/2) — BEJDL W., Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der menschlichen Haut mit pH abgestuften Farblösungen (3/4) — BEJDL W., Fettstoffe im Nerv. Feststellungen gegenüber Coronini und Alsterberg (11/12) — BOERNER D., Fluoreszenzmikroskopische Studien an der Haut (9/10) — BRAUNSTEINER H., Die „Hämatexodien“ im Elektronenmikroskop (5/6) — BRETSCHNEIDER L. H., Die Herstellung von dünnen Gewebsschnitten und ihre Untersuchung mit dem Elektronenmikroskop (1/2) — BRETSCHNEIDER L. H., Elektronenmikroskopische Untersuchung einiger Ziliaten (11/12) — BUCHER O., Zur Methodik karyometrischer Untersuchungen an Gewebekulturen (5/6) — CHOLNOKY B. J., Beobachtungen über die Farbstoffaufnahme anthozyanführender Zellen (5/6) — CHRISTIANI A. und STENGEL F., Standardisierung der zytylischen Reaktion als Methode zur Bestimmung dysoxybiotischer Stoffwechselprodukte (3/4) — DANGL F., Bemerkungen zur Vitalfluorochromierung mit Akridinorange (5/6) — DRAGESCO J., Le traitement anti-reflets en microscopie (5/6) — FINDEIS A., Das Entwickeln von mikrophotographischen Aufnahmen mit einem Tageslicht-Entwicklungsgerät (11/12) — FITZER E., Spezifische Ätzfärbungen an Eisen-Silizium-Legierungen. Eine neue Schnellmethode zum Erkennen hochprozentiger Eisen-Silizium-Legierungen (7/8) — FOOT N. CH., Über den Wert und die Bedeutung der exfoliativen Zellforschung für die Krebsdiagnose (1/2) — HABERLANDT H. und KÖHLER A., Über die praktische Verwendbarkeit von Polarisationsfiltern an Stelle Nicolischer Prismen (1/2) — HASELMANN H., Beiträge zur Phasenkontrast-Mikroskopie (9/10) — HENNEBERG O. H., Über den Nachweis thermischer Veränderungen in der Muskulatur durch die Van-Gieson-Färbung (5/6) — JASCHEK W., Ein neuer Spektrprojektor (7/8) — JELLINEK S., Histographik und biotische Aspekte des elektrischen Stromes (11/12) — KEUNING F. J., Das Phasenkontrastverfahren in der Mikroskopie (3/4) — KINZEL H., Die Algen Spirogyra und Zygnema bei Behandlung mit Kupferoxydammoniak (3/4) — KISSER J. und STEININGER A., Versuche zur Haltbarmachung der Phloroglucin-Salzsäure-Reaktion (1/2) — KNUTH-WINTERFELDT E., Electropolishing with special reference to two commercial types of polishing apparatus for metallographic purposes (7/8) — KOFLER A., Über Polymorphie (7/8) — KOFLER L., Über das Heiztischmikroskop und seine Zusatzgeräte (7/8) — MEIXNER H., Über die behelfsmäßige Prüfung von Lichtfiltern mittels der Biot-Kleinschen Quarzplatte im Polarisationsmikroskop (11/12) — NOWOTNY H. und HOLIK L., Mikroskopische Untersuchungen an Aluminiumfolien (1/2) — ONITSCH E., Beitrag zur Systematik metallographischer und mineralogischer Gefügeuntersuchungen (3/4) — PIACENTINI L., Beitrag zum Studium der Tumorzellen im Elektronenmikroskop (9/10) — PISCHINGER A., Über die Verwendungsmöglichkeit des Elektronenmikroskops in der zyto- und histologischen Forschung (11/12) — RAETHER H., Über die Struktur mechanisch und elektrolytisch polierter Oberflächen (5/6) — SCHUMANN H., Abbildung und Messung von Porenräumen in Gesteinen (1/2) — STACH E., Die Entspiegelung der Auflichtobjektive (9/10) — STOCKINGER F., Fluorochromierungsstudien an der Kopfhaut (3/4) — STOUT A. P., Hemangiopericytoma (1/2) — STUNDL K., Die Bedeutung der Sestonuntersuchung für die Fließgewässerforschung (11/12) — TERTSCH H., Beobachtungen über Vickers-Mikrohärte am Kalkspat (7/8) — WETZEL W., Die Mikroskopierung von Salzgesteinen (9/10) — ZEIGER K., Autonome und physikalisch-chemische Zytologie (9/10) — **Referate:** Sammelreferat: HAUSNER H. H., Report on the Annual Meeting of the Electron Microscope Society of America (11/12) — MITSCHKE R., Floris Osmond (3/4) — Allgemeine Mikroskopie, Instrumente und Verfahren (5/6, 7/8, 9/10, 11/12) — Biologie, Histologie, Pathologie, Mineralogie, Metallographie (1/2, 5/6, 9/10, 11/12) — Technologie (1/2, 11/12) — Buchbesprechungen (5/6, 7/8, 9/10, 11/12) — Neue Listen (7/8, 9/10, 11/12)

VERLAG GEORG FROMME & CO. IN WIEN

Sonderbände der Zeitschrift »MIKROSKOPIE«

Herausgegeben von Dr. Fritz BRÄUTIGAM und Prof. Dr. Alfred GRABNER

1. Sonderband

Beiträge zur Fluoreszenzmikroskopie

Herausgegeben von Dr. Fritz BRÄUTIGAM und Prof. Dr. Alfred GRABNER

1949. Großoktav. 130 Seiten mit 26 Abbildungen (davon 20 Farbbilder)

Arbeiten von F. BRÄUTIGAM, A. GRABNER, H. EPPINGER, H. HABERLANDT, K. HÖFLER, A. KÖHLER, Th. MÜLLNER-HAITINGER, V. PATZELT, S. STRUGGER, H. ZIEGENSPECK.

2. Sonderband

Das Mikroskop und seine Nebenapparate im Dienst der Naturwissenschaften, Medizin und Technik

Von Prof. Dr. Viktor PATZELT, Wien

Mit einem Beitrag über Polarisationsmikroskopie

Von Prof. Dr. Franz RAAZ, Wien

1950. Großoktav. 162 Seiten mit 118 Abbildungen (davon 4 Farbbilder)

Dieser Leitfaden will, wie schon der Titel besagt, jeden, der mit dem Mikroskop arbeitet, mit den mechanischen und optischen Bestandteilen des Mikroskops genauestens vertraut machen und ohne besondere mathematische Voraussetzungen auch die Theorie der Bildentstehung und der Auflösungsbedingungen verständlich machen. Diese Kenntnisse werden dem Naturwissenschaftler, dem Mediziner und dem Techniker die wissenschaftlichen Grundlagen für seine mikroskopischen Untersuchungen liefern, so daß er sein Instrument richtig verwenden und voll ausnützen kann. Aus diesem Grunde werden neben allen gebräuchlichen mikroskopischen Untersuchungsmethoden auch die spezielleren, wie Ultraviolett-mikroskopie, Elektronenmikroskopie, Fluoreszenzmikroskopie, Ultramikroskopie, Phasenkontrastmikroskopie und Auflichtmikroskopie eingehend behandelt und mit Beispielen aus allen Wissensgebieten belegt. Mit Rücksicht auf die auch in der Biologie wie überhaupt in allen wissenschaftlichen Disziplinen sich immer mehr verbreitenden Untersuchungen im polarisierten Licht ist dem Leitfaden ein Beitrag über Polarisationsmikroskopie von Prof. RAAZ hinzugefügt worden, der in klarer und übersichtlicher Weise mit den Grundbegriffen der Polarisationsmikroskopie vertraut macht und die bisherige Scheu vor den Untersuchungen im polarisierten Licht überwinden hilft. Der Sonderband ist mit einer großen Anzahl erstklassiger Abbildungen, die zu einem guten Verständnis erforderlich sind, ausgestattet und enthält Literaturhinweise, die hauptsächlich aus der neuesten Zeit stammen.

3. Sonderband

Mikroskopische und chemische Beiträge zum Krebsproblem

Mit besonderer Berücksichtigung der zytologischen Krebsdiagnostik

Redigiert von Prof. Dr. Carmen CORONINI, Wien

1949. Großoktav. 108 Seiten mit 61 Abbildungen (davon 5 Farbbilder)

Diese in einem Sonderband zusammengefaßten Arbeiten namhafter in- und ausländischer Forscher stellen einen wertvollen Beitrag zum Krebsproblem dar. In kurzen und übersichtlichen Mitteilungen wird der neueste Stand der Krebsforschung auf mikroskopischem Gebiet beleuchtet, wobei die zytologische Krebsdiagnostik eingehende Berücksichtigung findet. Das Buch ist auf Kunstdruckpapier gedruckt, wodurch die Reproduktionen tadellos zum Ausdruck kommen.

VERLAG GEORG FROMME & CO. IN WIEN

